

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**

**GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**EFFECTO DEL TAMAÑO DE PARTICULA SOBRE  
LA COMPOSICION QUÍMICA, LAS PROPIEDADES  
FÍSICO-QUÍMICAS Y TECNO-FUNCIONALES DE  
HARINAS OBTENIDAS DE LA CÁSCARA DEL  
GRANO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Julio 2021**

**Autor: Sara Romero López**

**Tutor: Manuel Viuda Martos**

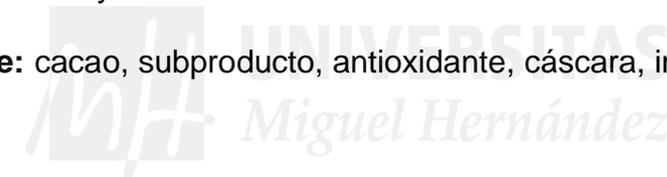


# **EFFECTO DEL TAMAÑO DE PARTICULA SOBRE LA COMPOSICION QUÍMICA, LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y TECNO-FUNCIONALES DE HARINAS OBTENIDAS DE LA CÁSCARA DEL GRANO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)**

## **Resumen:**

A partir del cacao se obtienen numerosos productos generando así una gran cantidad de subproductos. El mayor de los subproductos del cacao es la cáscara del grano (CGC) la cual representa entre un 12% y un 20% del mismo. El objetivo de este estudio fue la valoración de este subproducto como ingrediente alimentario, y para ello previamente se caracterizó la influencia del tamaño de partícula en las propiedades químicas, físico-químicas, tecno-funcionales y en el contenido de fenoles, flavonoides, taninos y poder antioxidante mediante los métodos DPPH, FRAC, ABTS y FIC.

**Palabras clave:** cacao, subproducto, antioxidante, cáscara, ingrediente



## **CHEMICAL, PHYSICOCHEMICAL AND TECHNO-FUNCTIONAL EVALUATION OF COCOA BEAN SHELL**

## **Abstract:**

Many products are obtained from cocoa, generating a large amount of by-products. The largest of the cocoa by-products is the bean shell (CGC) which represents between 12% and 20% of it. The main of this study was the evaluation of this by-product as a food ingredient, and for this was previously characterized the influence of the particle size on the chemical, physicochemical, techno-functional properties and on the content of phenols, flavonoids, tannins and antioxidant power through the DPPH, FRAC, ABTS and FIC methods.

**Key words:** cocoa, by-product, antioxidant, shell, ingredient

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
1.1 HISTORIA DEL CACAO	6
1.2 DIVERSIDAD VARIETAL	7
1.3 MANEJO POSTCOSECHA DE LAS SEMILLAS DEL CACAO	8
1.4 VOLÚMENES MUNDIALES DE LA PRODUCCIÓN	10
1.5 PRODUCTOS Y SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA DEL CACAO	13
1.6 PARÁMETROS DE CALIDAD	14
1.7 COMPUESTOS BIOACTIVOS	16
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL	22
3.2. OBTENCIÓN DE HARINAS CON DISTINTOS TAMAÑOS DE PARTÍCULA	22
3.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA	22
3.3.1 GRASA	22
3.3.2 PROTEÍNAS	23
3.3.3 CENIZAS	23
3.3.4 HUMEDAD	23
3.4 CONTENIDO DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y AZÚCARES	23
3.4.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS	23
3.4.2. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).	24
3.5. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	24
3.5.1. pH	24
3.5.2 ACTIVIDAD DE AGUA (Aw)	25
3.5.3 COLOR	25
3.6. PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES	25
3.6.1. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA)	25
3.6.2 CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE ACEITE (CRO)	26
3.6.3 CAPACIDAD DE HINCHAMIENTO (SWC)	26
3.7. DETERMINACIÓN DEL PERFIL POLIFENÓLICO	27
3.7.1. EXTRACCIÓN	27
3.7.2. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	27
3.8. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN METILXANTINAS	28
3.9. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	28
3.9.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE UTILIZANDO EL MÉTODO DEL RADICAL 2,2'-DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL (DPPH)	28

3.9.2. PODER ANTIOXIDANTE POR REDUCCIÓN DEL IÓN FÉ- RRICO (FRAP)	28
3.9.3. CAPACIDAD QUELANTE DEL IÓN FERROSO (FIC)	29
3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
4.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA	30
4.2 ÁCIDOS ORGÁNICOS Y AZÚCARES	31
4.3 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y TECNOFUNCIONALES	33
4.4 PERFIL POLIFENÓLICO	35
4.5 CONTENIDO DE METILXANTINAS	38
4.6 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES	40
<b>5. CONCLUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>43</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. HISTORIA DEL CACAO

El cacao es el fruto de la planta *Theobroma cacao L.*, el cultivo de esta planta parece tener su origen en la cuenca del río Amazonas en Sudamérica ya que en esta zona se observa una gran variedad de características fisiológicas y morfológicas. Se cree que la primera en domesticar el cultivo, y también en favorecer su expansión a través de las cadenas montañosas a otras regiones fue la cultura olmeca que se localizaba en Mesoamérica, y a esta cultura le siguieron otras como la cultura maya y más tarde la tolteca y la azteca. Se han encontrado evidencias, como vasijas que muestran la influencia simbólica y ritual que tuvo en la cultura mesoamericana la almendra del cacao la cual al parecer fue muy utilizada en la gastronomía junto al maíz, y también fue consumida en bebidas las cuales tenían una gran importancia en rituales y también en la vida política y social de las clases más altas. Estas bebidas de cacao podían elaborarse de diversas formas y aderezarse con distintas especias que le otorgaban sabor (Caso Barrera, 2016).

Tras la llegada de los españoles en el siglo XVI, la expansión del cacao y de las formas de consumo se vio influenciada por ellos. Los españoles probaron la bebida y decidieron modificarla agregándole azúcar y canela entre otras especias, y además decidieron consumirla también caliente. Esta forma de consumo de la bebida se extendió por España y otros países europeos donde la bebida tuvo una gran acogida haciéndose muy popular entre la alta sociedad (Caso Barrera, 2016). La conquista también propició que el cultivo del cacao se extendiera a otras zonas, como Sudamérica y el Caribe. Venezuela fue uno de los primeros países donde se desarrolló el cultivo (Wood y Lass, 2001). Simultáneamente a esta expansión del cultivo se realizaron otras, mediante las cuales el cultivo llegó a desarrollarse en Filipinas, en algunas zonas de Indonesia como las islas Sula-wesi y Java, y también en otros países como Sri Lanka e India.

Más tarde, durante el siglo XVIII, comenzó a desarrollarse el cultivo del cacao en Ecuador y Brasil, en estos países el cultivo fue denominado Forastero. En el año 1822, tras la independencia de Brasil, el cultivo fue trasladado por

distintas zonas del país para finalmente acabar en el estado de Río Grande desde donde fue trasladado a Fernando Po, una zona ubicada en Guinea Ecuatorial, que se encuentra en el continente africano. Desde Guinea, y durante el siglo XIX, el cultivo fue llevado a otros países del oeste de África como Ghana y Nigeria.

## 1.2. DIVERSIDAD VARIETAL

Las plantaciones de cacao que existen actualmente en las distintas zonas de cultivo alrededor del mundo, están basadas en su mayoría en variedades tradicionales, y solo un tercio del cacao cultivado a nivel mundial procede de variedades híbridas o de clones procedentes de programas de mejora genética (Eskes y Lanaud, 2001).

Las variedades que se consideran tradicionales son tres: Criollo, Forastero y Trinitario. El cacao Forastero recibe su nombre en Venezuela donde utilizaban el término Forastero, que significa extraño, para hacer referencia al cultivo de cacao introducido desde Trinidad en 1825. El cacao de la variedad Forastero que se cultiva en zonas de Brasil, Ecuador y el occidente africano se denomina forastero amazónico (Wood y Lass, 2001). Por otro lado, la variedad Trinitario procede de diversos cruzamientos entre los cultivos Criollo y Forastero amazónico (Wood y Lass, 2001). Esta variedad es muy heterogénea debido a su origen, y se puede encontrar en el Caribe y Centroamérica, además de en otros lugares donde haya una mezcla de germoplasma de las variedades Criollo y Forastero amazónico (Wood y Lass, 2001). En la actualidad, de las tres variedades mencionadas, la variedad que menos se cultiva es la del tipo Criollo ya que en solo un 5 % de las plantaciones de cacao a nivel mundial predominan plantas de esta variedad, mientras que en el 95 % de las plantaciones predominan árboles del tipo Trinitario y Forastero amazónico (Badrie et al., 2015; ICCO, 2018).

Mundialmente, los granos de cacao de la variedades Criollo y Trinitario se reconocen de una calidad superior, ya que son de aroma suave y tienen sabores especiales afrutados, especias, caramelo, nueces y vainilla (Eskes y Lanaud, 2001). Los frutos del cacao, de la variedad Criollo tienen cáscara delgada, una

superficie rugosa y una forma puntiaguda; aunque también pueden presentar una superficie lisa y forma pentagonal. Por otro lado, el color de sus cotiledones es blanco o ligeramente púrpura, esto se debe a la baja concentración de antocianinas. Los frutos del cacao del tipo Forastero presentan un ápice robusto y una superficie lisa mientras que su forma varía entre oblongada y amelonada. Los frutos de esta variedad de cacao son de tamaño pequeño y aplanados de color púrpura. El sabor que presentan estos frutos es amargo y astringente, y además tienen una mayor cantidad de grasa que los frutos de la variedad Criollo, y es por este motivo que son más atractivos para el mercado (Badrie et al., 2015). Los frutos de la variedad de cacao Trinitario son de cáscara resistente, característica que ha obtenido del cacao forastero; por otro lado, su sabor es suave como en el caso del cacao Criollo, con una cáscara semirrugosa y una forma ovalada con ápice agudo, acuminado u obtuso. Sus cotiledones son de color rosado, o de un leve color púrpura, y su sabor es menos amargo y astringente que en el caso del cacao de tipo forastero (Álvarez et al., 2002).

### 1.3. MANEJO POSTCOSECHA DE LAS SEMILLAS DE CACAO

Tras la recolección de las mazorcas, se inician una serie de tratamientos de las mismas con el objetivo de prepararlas para el posterior procesado. Estos tratamientos constan del desgrane, la fermentación y el secado de las mazorcas.

En primer lugar, se realiza la cosecha cuando las mazorcas se encuentran maduras. La cosecha se realiza de forma manual utilizando distintas herramientas como las tijeras de poda o cuchillas.

En siguiente lugar, las mazorcas son desgranadas de forma manual extrayendo las semillas de las mismas. A continuación, se realiza la fermentación este paso es necesario ya que confiere a las semillas de cacao efectos beneficiosos sobre la salud y también el aroma y sabor característicos del cacao, por este motivo es esencial que el manejo de las semillas en postcosecha sea el adecuado (Deus et al., 2020). El proceso de fermentación presenta diferencias según en los países donde se realice, en los países de centro, Sudamérica y algunas zonas de Asia, la fermentación se realiza en contenedores de madera

con capacidad de mil kilos; mientras que en países del continente africano la fermentación tiene lugar sobre el suelo, donde las semillas son apiladas y tapadas con hojas (John et al., 2019).

El proceso de fermentación depende de las condiciones ambientales de temperatura, es una fermentación alcohólica producida en ausencia de oxígeno donde predominan las levaduras y las bacterias lácticas que generan ácidos orgánicos y etanol, la duración del proceso es variable y suele ser de una semana. La fermentación es exotérmica, y mientras ocurre las temperaturas se elevan llegando a alcanzar los 35 °C, debido a estas altas temperaturas, el embrión muere lo que hace que la semilla no pueda germinar, y además se desencadena una serie de reacciones bioquímicas, que son las responsables del sabor y aroma característicos de estas semillas. Durante el proceso, las levaduras liberan enzimas pectinolíticas las cuales se encargan de degradar los polisacáridos presentes en la pulpa mucilaginoso (Kouamé et al., 2020).

Las semillas carecen de mucílago lo que favorece que se desarrollen, en presencia de oxígeno, bacterias ácido-acéticas. Estas bacterias son las responsables de la conversión del etanol, procedente de la fermentación alcohólica, en ácido acético mediante una reacción de oxidación que se produce de forma exotérmica y eleva las temperaturas hasta los 50 °C (Kouamé et al., 2020). Además, la masa de fermentación ha de removerse, lo que es esencial para que la misma se airee y el proceso se lleve a cabo de forma homogénea (Hernández-Hernández et al., 2016).

La calidad del grano y el contenido de nutrientes del mismo se ven afectados por el proceso de fermentación y sus condiciones, de forma que en los granos que no se someten a fermentación el contenido de proteínas es más elevado que en los que sí fueron sometidos a dicho proceso (Servent et al., 2018). Lo mismo ocurre con el contenido de los distintos micronutrientes, aunque en este caso se ha observado que el contenido de los mismos también puede aumentar mientras los granos están almacenados.

El siguiente paso del procesado tiene lugar tras la fermentación, y es el proceso de secado de los granos. Este proceso tiene como objetivo que los granos alcancen una humedad del 7 %. Si la humedad fuera más elevada podrían desarrollarse moho y distintas bacterias en los granos; y si el contenido en humedad fuera más bajo podrían romperse la cascarilla y el cotiledón (European Cocoa Association, et al., 2015). El proceso de secado puede producirse de dos formas principales, la primera es el secado natural que suele llevarse a cabo sobre suelo de hormigón y bajo una estructura similar a un invernadero, esta forma es la más común cuando se trata de pequeños productores; la segunda forma es el secado artificial, llevado a cabo en construcciones de hormigón en las cuales se introduce aire caliente, esta forma supone un coste mayor lo que hace que sea más común cuando se trata de grandes productores.

#### 1.4. VOLÚMENES MUNDIALES DE PRODUCCIÓN

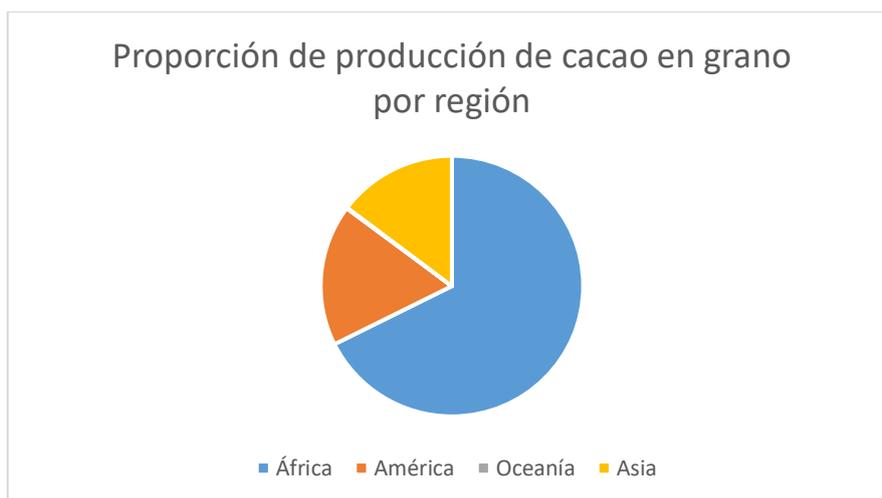
En cuanto a la producción mundial de cacao en el año 2019 fue de 5.596.397 toneladas, de las cuales el 67,5 % proviene del continente africano y supone una gran diferencia con respecto al resto de continentes ya que los siguientes son América donde se produce el 17,4 % y Asia a quien corresponde el 14,6 %, por último, se encuentran Oceanía donde la producción es solo del 0,9 % con respecto a nivel mundial, y Europa donde la producción de cacao no es relevante (FAO, 2020).

En la Figura 1 se observa la producción de grano de cacao por países:



**Figura 1.** Cantidad producida de grano de cacao por países (FAO, 2020)

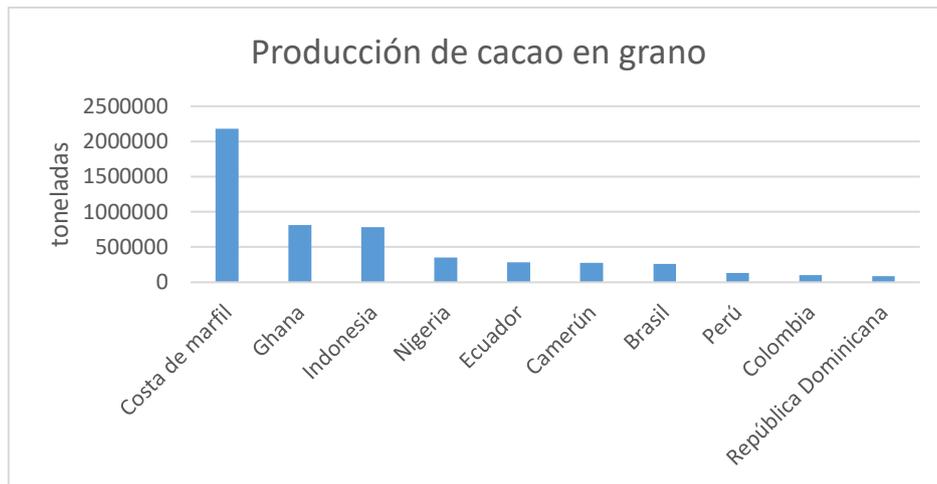
En la Figura 2 se observa la producción de grano de cacao por región:



**Figura 2.** Proporción de producción de cacao en grano por región (FAO, 2020)

Si se observa la producción de cacao por países (Figura 3), se encuentra que el principal productor en el año 2019 fue Costa de Marfil con un total de 2.180.000 toneladas, le siguen Ghana con 811.700 toneladas, Indonesia con 783.978 toneladas, Nigeria con 350.146 toneladas y Ecuador con una producción de 283.260. Con una producción menor, se encuentran Camerún cuya producción es de 280.000 toneladas, Brasil con una producción de 259.425 toneladas, Perú con 135.928 toneladas, Colombia con 102.154 toneladas y por último República Dominicana donde la producción fue de 88.961 toneladas en el año 2019 (FAO, 2020).

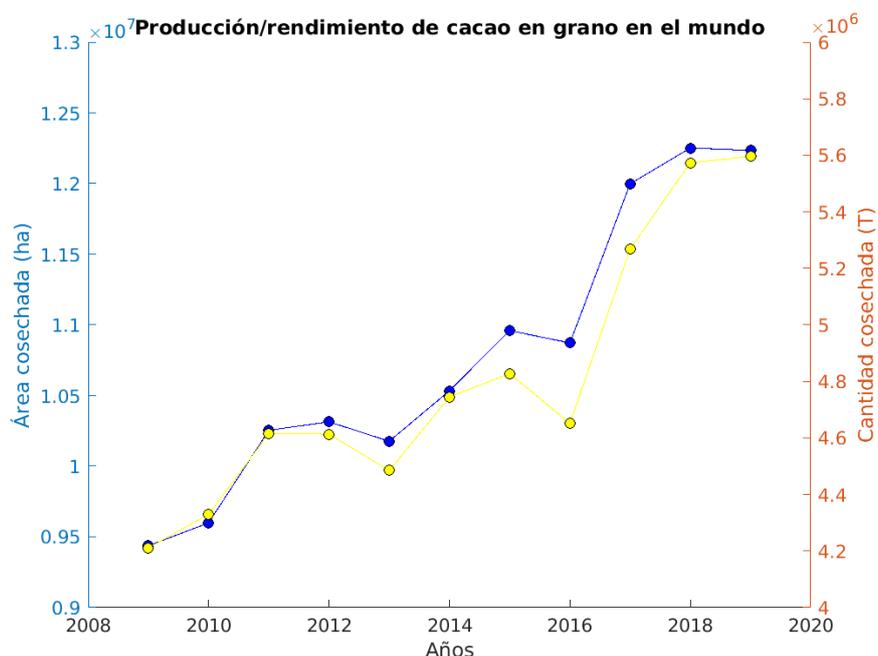
En la Figura 3 se observa la cantidad en toneladas producida por los diez principales países productores:



**Figura 3.** 10 principales países productores de cacao en grano (FAO, 2020)

Por otro lado, es destacable el aumento que ha sufrido la producción mundial de cacao en la última década, del año 2009 al año 2019 (Figura 4). Aunque se mantienen los mismos países como principales productores, la producción ha aumentado alrededor de un 25 % siendo la producción mundial de cacao en el año 2009 de 4.211.424 toneladas y la producción mundial del año 2019 de 5.596.397 toneladas como ya hemos mencionado anteriormente (FAO, 2020).

En la Figura 4 se observa la comparación de las toneladas producidas de cacao y el área cosechada entre los años 2009 y 2019:



**Figura 4.** Producción / Área cosechada de grano de cacao en el mundo (FAO, 2020)

## 1.5. PRODUCTOS Y COPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA DEL CACAO

A partir de los granos secos del cacao se pueden obtener diversos productos, así como la torta de cacao, la manteca de cacao y el cacao en polvo. El procesamiento de estos productos tiene algunos pasos en común.

En primer lugar, se realiza la limpieza de los granos donde se les extraen las materias extrañas que puedan contener, más tarde los granos son sometidos a tratamiento térmico o tostado con el fin de parar las reacciones bioquímicas que se iniciaron en la fermentación y el secado. El siguiente paso es el quebrado de los granos donde se aprovecha para separar la cáscara y el embrión; a continuación, los granos ya quebrados se someten a un proceso de molido del cual se obtiene la pasta de cacao, si se continúa con el proceso sometiendo a la pasta de cacao a un prensado se obtienen la manteca de cacao y la torta de cacao, la cual si es sometida de nuevo al prensado de lugar al cacao en polvo (Okiyama et al., 2017).

Estos productos se comercializan por separado, y tienen usos distintos entre ellos; de esta forma la manteca se comercializa en la industria alimentaria para la elaboración de chocolate, helados y productos de confitería entre otros, y también es comercializada en la industria farmacéutica para la fabricación de lubricantes, cosméticos, medicamentos y jabones entre otros. Por otra parte, el cacao en polvo es solo comercializado en la industria alimentaria para la elaboración de chocolate, coberturas y productos de confitería entre otros (Afoakwa, 2016).

Este proceso da lugar a varios subproductos, por un lado, se obtiene la cascarilla del cacao la cual es considerada un desecho (Okiyama et al., 2017). Este subproducto supone entre el 12 y el 20 % del peso total de cada grano de forma que, si la producción mundial es de 4,2 millones de toneladas anuales, cada año se extraen 800 mil toneladas de cascarilla (ICCO, 2018).

Otro subproducto obtenido durante el proceso es la cáscara de la mazorca, las cuales son tratadas como desecho, y debido al alto porcentaje en peso

que representan de la mazorca, son el principal desecho, llegando a representar un 17 % del peso total de la semilla de cacao (Rojo-Poveda et al., 2020). La eliminación de este subproducto puede suponer problemas económicos por el coste que supone, además de problemas medioambientales puesto que contiene polifenoles con potencial actividad fitotóxica y una cantidad considerable de teobromina, la cual se ha demostrado que puede ser tóxica para algunos mamíferos, además también se ha podido demostrar la toxicidad de este subproducto en ambientes acuáticos (Rojo-Poveda et al., 2020).

Por otro lado, se ha visto un aumento en la demanda de ingredientes naturales; esta demanda ha hecho que diversos investigadores planteen la posibilidad de obtener nuevos ingredientes a partir de subproductos que anteriormente habían sido considerados como desechos. Teniendo en cuenta esta creciente tendencia, podemos considerar que los subproductos del cacao podrían ser utilizados como ingrediente debido a sus características y composición (Mariatti et al., 2021). Esta idea de utilizar los subproductos del cacao como ingrediente, principalmente la cáscara ya ha surgido en otras ocasiones, llegando a existir diversas patentes para este uso de la misma.

## 1.6. PARÁMETROS DE CALIDAD

Para determinar la calidad del grano y su rendimiento, se utilizan diversos parámetros como la presencia de materias extrañas, la humedad, el peso seco, la proporción de cascarilla, el grado de fermentación, el pH, el contenido de grasa y de ácidos grasos libres y sus características organolépticas (Sukha et al., 2008).

La presencia de materias extrañas como hojas secas, piedras, restos de cáscara e incluso plástico entre otros no es deseable, ya que supone una fuente de contaminación y además tiene efectos negativos sobre el rendimiento y el sabor de los granos de cacao; a pesar de esto, valores cercanos al 2 % de materias extrañas pueden llegar a ser aceptables (European Cocoa Association et al., 2015).

El contenido en humedad debe ser del 7 % ya que, por un lado, un contenido menor debilita la cascarilla y el cotiledón, aumentando así el porcentaje de granos rotos los cuales no son deseables ya que presentan un mayor índice de lipólisis al encontrarse expuesta al oxígeno una mayor superficie del grano; por otro lado, un contenido mayor de humedad puede favorecer el crecimiento en los granos de diversos mohos y bacterias.

En cuanto al peso seco y la proporción de cascarilla, el peso seco necesario suele ser de 1 gramo, y la proporción de cascarilla ideal es alrededor del 11 %. El grado de fermentación se evalúa mediante la prueba de corte, en la cual 300 granos de cacao son cortados de forma transversal y evaluados de forma visual. Durante la realización de esta prueba han de detectarse granos germinados, planos, dañados por insectos, mohosos o pizarrosos.

Respecto al contenido de grasa, este es un parámetro importante ya que cuanto mayor sea el contenido de grasa, se obtiene un mayor rendimiento a la hora de extraer de los granos la manteca de cacao. Por este motivo, la industria considera un contenido de grasa óptimo el que es igual o superior al 55 % en base a peso seco del grano sin cascarilla (Lockwood y Yin, 1993). Por otro lado, también es evaluado el contenido en ácidos grasos libres y este parámetro no debe superar el 1 % ya que un contenido más elevado de ácidos grasos libres, puede indicar que los granos están enfermos, han sufrido un secado lento o una mala fermentación, que son granos rotos o que no han sido almacenados en las condiciones de humedad adecuadas (Tagro Guehi et al., 2008).

Por último, es también importante la evaluación de las características organolépticas de los granos. Entre estas características, la más importante es el sabor y para su evaluación se analizan distintos atributos como el amargor, la astringencia, la acidez residual, las notas de sabores afrutados, los sabores no deseados como el moho y el humo y, por supuesto, la intensidad del sabor a chocolate. Además de estos atributos, un panel de cata entrenado puede tam-

bién llegar a identificar sabores procedentes de fuentes externas que son contaminantes como el caucho, el coco y algunas sustancias químicas entre otros (European Cocoa Association et al., 2015).

Los parámetros de calidad mencionados se pueden clasificar en distintos grupos según el interés industrial, el interés medicinal y la influencia en el sabor y el aroma que presentan. De esta forma, dentro del interés industrial se encuentran parámetros como el contenido de grasa, de fenoles totales y el perfil fenólico donde se miden la catequina y la epicatequina. Por otro lado, dentro del interés medicinal podemos encontrar el perfil fenólico, el contenido de teobromina y también de cafeína. En la influencia sobre el sabor y el aroma se incluyeron el contenido de azúcares, de fenoles totales y también los de teobromina y de cafeína (Araujo et al., 2014).

De los parámetros mencionados anteriormente se han determinado también sus valores óptimos. El valor óptimo para el pH de los granos de cacao es de 6,01, el contenido óptimo de cafeína es de 0,58 g/ 100 g. De los contenidos de grasa es valor mínimo es de 30,77 g/ 100 g. En cuanto al contenido de fenoles totales se estableció su límite inferior en 46 mg/ g, mientras que el mínimo aceptable para el contenido de catequina es de 0,08 mg/ g, en el caso de la epicatequina el valor es de 2,22 mg/ g, y en el de la teobromina de 0,25 mg/ g (Araujo et al., 2014).

Otros parámetros importantes son el contenido de azúcares y de proteínas ya que estos tienen una gran importancia en el desarrollo del sabor y del aroma de los granos y de las semillas de cacao en las etapas de fermentación, secado y tostado (Bertazzo, Agnolin, et al., 2011). Pero de estos parámetros no se han establecido unos límites o valores óptimos que ayuden a medir la calidad de los granos y semillas en la industria.

## 1.7. COMPUESTOS BIOACTIVOS

Entre los parámetros de calidad que se han mencionado anteriormente, se encuentran algunos compuestos bioactivos. Los compuestos bioactivos son

sustancias químicas que intervienen en el metabolismo secundario de los vegetales. Estas sustancias pueden cumplir diversas funciones de forma que pueden ser consideradas pigmentos, aromas, reguladores del crecimiento y de la reproducción y también como protectores naturales frente a diversos parásitos. Estas sustancias son necesarias en humanos ya que tienen diversos efectos beneficiosos sobre la salud como el efecto protector del sistema cardiovascular, la disminución de la presión arterial y también la regulación de la glucemia y del colesterol, así como mejorar el sistema inmune y también reducir el riesgo de padecer algún tipo de cáncer (Oracz et al., 2015).

Los granos de cacao presentan gran cantidad de compuestos bioactivos, como son los compuestos fenólicos los cuales ejercen de antioxidante natural y además suponen un 10 % del peso seco de los granos de cacao (Rusconi y Conti, 2010). Para poder determinar los componentes bioactivos que se encuentran en los granos de cacao, se han realizado estudios utilizando distintos tipos de cacao comercial, donde se han encontrado en los granos diversos compuestos como la epicatequina, la catequina y el ácido cafeico los cuales pertenecen al grupo de los flavonoides, y también otros compuestos como la teobromina y la cafeína pertenecientes al grupo de las metilxantinas (Belščak et al., 2009).

Estos compuestos tienen una gran importancia ya que contribuyen al desarrollo de características sensoriales de los granos de cacao y de los productos derivados de él. Esta contribución se debe a que son capaces de formar complejos con polisacáridos y proteínas (Niemenak, et al., 2006). Estos compuestos tienen también otros papeles importantes en el cacao ya que son los que confieren la capacidad antioxidante a los distintos productos que se elaboran a partir del cacao (Jalil e Ismail, 2008).

Los fenoles son compuestos bioactivos, producto del metabolismo secundario de los vegetales, y están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son compuestos aromáticos los cuales en sus seis anillos de carbono poseen un grupo hidroxilo (Wollgast y Anklam, 2000). Los fenoles se encuentran en las células pigmentadas de los cotiledones, y son los compuestos que les proporcionan

a estos sus colores característicos (Oracz et al., 2015). En cuanto al cacao, estos compuestos se encuentran formando complejos con polisacáridos y proteínas en las células pigmentadas, y por este motivo son compuestos con gran importancia en las características organolépticas del cacao (Niemenak et al., 2006).

Dentro de los compuestos fenólicos se encuentra el grupo de los flavonoides, de los cuales se pueden encontrar tres grupos en el cacao. En primer lugar, encontramos las catequinas, y dentro de ellas la principal es la (-)-epicatequina la cual supone el 35 % del contenido fenólico total, los valores de este compuesto en granos de cacao fermentado se encuentran entre 0,57 y 1,62 mg/ g. Dentro de las catequinas también encontramos, aunque en menor cantidad, otros compuestos como la (+)-catequina, (+)-galocatequina y (-)-galoepicatequina. En segundo lugar, se encuentran las antocianinas, y dentro de este grupo están incluidas la cianidina-3- $\alpha$ -L-arabinósido y la cianidina-3- $\beta$ -D-galactósido. En el cacao también podemos encontrar compuestos como los flavonol-glicósidos y otros fenoles como la clovamida y la deoxiclovamida (Wollgast y Anklam, 2000). En cuanto a los ácidos fenólicos, en el cacao se pueden encontrar los hidroxibenzoicos, hidroxicinámicos y el ácido clorogénico (Oracz et al., 2015). Por otro lado, los enantiómeros de las catequinas como son la (-)-catequina y la (+)-epicatequina no suelen poder encontrarse de forma natural en los granos de cacao (Hurst et al., 2011).

Otros compuestos bioactivos en el cacao son las metilxantinas, las cuales son de estructura similar a las xantinas que son unos compuestos de la familia de las purinas que son producidos por las células humanas y que además también pueden encontrarse de forma natural en algunas plantas como las del té, cacao y el café. En cuanto a las metilxantinas que se encuentran en el grano de cacao, estas son la teobromina y la cafeína (Martínez-Pinilla et al., 2015). La teobromina es la metilxantina predominante a día de hoy, y la cantidad de ella que se puede encontrar en los granos de cacao varía de 7 a 15 mg/ g de peso seco. Por otro lado, la cafeína se encuentra en menor cantidad en los granos de cacao, y las proporciones de ella que se pueden observar en dichos granos es de 0,7 a 2 mg/ g de peso seco (Martínez-Pinilla et al., 2015).

La cantidad que se encuentra en los granos de cacao de los compuestos fenólicos mencionados anteriormente es variable en función de diversos factores como los factores genéticos, la variedad, la región donde es producido el cacao y el procesamiento al que son sometidos los granos de cacao (Oracz et al., 2015). En cuanto a la variedad hay estudios que determinan que el contenido de fenoles totales en cacao Criollo es de dos tercios en comparación con el cacao Forastero (Oracz y Nebesny, 2016). Por otro lado, y en cuanto a la procedencia del cacao hay estudios que han hallado importantes diferencias en el contenido de fenoles totales de cacao de la variedad Forastero que procedían de diferentes regiones, estas diferencias variaban alrededor del 1,2 y el 1,3 % siendo el cacao de Madagascar el que presentaba un mayor valor, y el de Colombia el de menor valor (Natsume et al., 2009; Radojicic et al., 2009). El procesamiento de los granos tiene importancia en este aspecto y hay estudios que muestran que el proceso de fermentación puede hacer que se reduzcan la catequina y la epicatequina. La reducción es mayor en la epicatequina la cual se encuentra en una proporción de 12 mg/ g en granos no fermentados, pero pasa a ser de 1 mg/ g si los granos han sido fermentados (Payne et al., 2010). Otros estudios señalan que la epicatequina y los fenoles que son solubles pueden ver su contenido reducido entre el 10 % y el 20 %, esto podría ser debido a la oxidación y la difusión de los exudados de la fermentación (Kim y Keeney, 1984). Por otro lado, la difusión de los exudados en el cotiledón conlleva un incremento de compuestos fenólicos y metilxantinas en la cascarilla del grano de cacao (Forsyth y Quesnel, 1957).

Cuando se trata de metilxantinas hay menos estudios que revelen como pueden afectar diversos factores a su contenido en los granos de cacao (Carrillo et al., 2014). Se han realizado estudios que señalan que el factor genético pueda influir en el contenido de metilxantinas en los granos de cacao ya que, al analizar diversas muestras de cacao no fermentado procedente de Colombia y entre las cuales se incluían las variedades tanto de cacao Criollo, como de Trinitario y Forastero, se encontraron variaciones en el contenido de teobromina de 7,1 mg/ g a 9,7mg/ g. En este estudio la cafeína también mostró diferencias en un rango de 0,7 mg/ g a 1,9 mg/ g (Carrillo et al., 2014). En cuanto a la influencia de la

variedad, algunos estudios señalan que se encontraron diferencias al analizar granos de cacao, procedentes del banco de germoplasma de Venezuela, de la variedad Criollo, Forastero y Trinitario; las diferencias fueron de 5 mg/ g a 12 mg/ g para la teobromina y de 1 mg/ g a 4 mg/ g en el caso de la cafeína (Brunetto et al., 2007). También, al analizar granos de cacao del banco de germoplasma de Venezuela, se hallaron diferencias en el contenido de metilxantinas según el grado de fermentación del cacao, ya que se observó que el contenido de teobromina y de cafeína se veían disminuidos al aumentar el tiempo de fermentación de 1 a 7 días (Brunetto et al., 2007). Las mediciones de estos estudios han sido en su mayoría realizadas en distintas muestras de cotiledón molido sin cascarilla.



## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo consistió en determinar el efecto de la reducción del tamaño de partícula sobre la composición química, las propiedades físico-químicas y tecno-funcionales así como el contenido en compuestos bioactivos, y actividad antioxidante de las harinas obtenidas de uno de los principales coproductos generados en la industria del chocolate como es la cascara del grano de cacao.

Para alcanzar este objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- ✚ Determinar el efecto de la reducción del tamaño de partícula sobre la composición química.
- ✚ Evaluar la reducción del tamaño de partícula sobre las propiedades físico-químicas como el color, pH y actividad de agua.
- ✚ Establecer el efecto de reducción del tamaño de partícula sobre las propiedades tecnofuncionales como la capacidad de retención de agua, capacidad de retención de aceite y la capacidad de hinchamiento.
- ✚ Valorar el efecto de reducción del tamaño de partícula sobre de compuestos bioactivos principalmente compuestos polifenólicos y metilxantinas.
- ✚ Determinar el efecto de la reducción del tamaño de partícula sobre la actividad antioxidante mediante el empleo de cuatro métodos distintos con diferentes mecanismos de acción.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL

Las cascaras del grano de cacao se obtuvieron de granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) ya secos y fermentados pertenecientes al cultivar forastero y que fueron cultivados en Ghana. Estas muestras fueron suministradas por chocolates Valor (Villajoyosa, Alicante, España)

#### 3.2. OBTENCIÓN DE HARINAS CON DISTINTOS TAMAÑOS DE PARTÍCULA

Las cascaras del grano de cacao se molieron en un molinillo durante 30 s. Transcurrido este tiempo las muestras obtenidas se pasaron por tamices con distinto tamaño de luz (701 y 417  $\mu\text{m}$ ). De este modo se obtuvieron harinas con diferente tamaño de partícula, las tres fracciones obtenidas fueron (i) superior (HBCS) con un tamaño de partícula mayor de 701  $\mu\text{m}$ ; (ii) intermedia (IHBS) con un tamaño de partícula inferior a 701  $\mu\text{m}$  y superior a 417  $\mu\text{m}$ ; y finalmente (iii) inferior (LCBS) con un tamaño de partícula menor de 417  $\mu\text{m}$ . La figura 5 muestra los tres tipos de harina obtenidos



**Figura 5.** Harinas de cascara de cacao con distintos tamaños de partícula. HBCS tamaño de partícula mayor de 701  $\mu\text{m}$ ; IHBS: tamaño de partícula inferior a 701  $\mu\text{m}$  y superior a 417  $\mu\text{m}$ ; LCBS: tamaño de partícula menor de 417  $\mu\text{m}$ .

#### 3.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

##### 3.3.1. GRASA

La determinación del contenido lipídico se realizó de acuerdo con el método oficial de la AOAC 24.005 (AOAC, 2007), utilizando el extractor Soxhlet J.O, Selecta Mo.6003286 (J.O Selecta S.A., Abrera, Barcelona, España) (Figura 17). Los resultados se expresaron en g grasa/100 g de muestra. Las muestras se analizaron por duplicado.

### 3.3.2. PROTEÍNAS

Para la determinación del contenido en proteínas, cuyo resultado se expresó en g de proteína/ 100 g de muestra, se realizó según el método AOAC 24.007 (AOAC, 2007). Utilizando el digestor Büchi Digestion Unit modelo 426 y el destilador Büchi Destillation Unit modelo B-316 (Büchi, Suiza). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y el factor que se usó fue de 6,25 para convertir el porcentaje de nitrógeno en porcentaje en proteína, el cual fue proporcionado directamente por el programa.

### 3.3.3. CENIZAS

El contenido de cenizas se determinó según el método de la AOAC 24.009 (AOAC, 2007), las determinaciones se realizaron por triplicado y el resultado fue expresado g cenizas/ 100 g muestra. Para su determinación se utilizó una mufla Habersal modelo 12- PR1300 PAD (Habersal S.A., Caldes de Montibui, Barcelona, España).

### 3.3.4. HUMEDAD

La determinación del contenido de humedad se realizó según lo descrito por el método de la AOAC 24.003 (AOAC, 2007), en él se somete a las muestras a una temperatura de 105 °C, hasta alcanzar peso constante. Se llevó a cabo en una estufa modelo P. selecta (Barcelona, España), los resultados se expresaron en g agua/100 g de muestra. La determinación se realizó por triplicado.

## 3.4. CONTENIDO DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y AZÚCARES

### 3.4.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Para la determinación del contenido de ácidos orgánicos y azúcares de las muestras de cascara de cacao, se adicionó a un tubo de centrifuga 0,5 g de muestra y 8 mL de agua ultrapura. Los tubos se introdujeron en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos, agitando manualmente las extracciones con una varilla cada 5 minutos para evitar que el extracto precipitara al fondo y así lograr una mejor extracción de los compuestos. Tras la agitación los tubos se centrifugaron a 4000 r.p.m. durante 5 minutos, y los sobrenadantes obtenidos se filtraron

a través de filtros de Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$  y se conservaron a 4 °C hasta la determinación del contenido en ácidos orgánicos y azúcares.

### 3.4.2. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

El contenido en ácidos orgánicos y azúcares de las aguas de lavado se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo Hewlett Packard HP-1100 (Woldbronn, Alemania) siguiendo las indicaciones de Melgarejo-Sánchez et al. (2015). Para ello 10  $\mu\text{L}$  de las distintas muestras fueron inyectados en una columna Supelcogel C-610 H, 300x7.8 mm, (Supelco, Bellefonte) equipada con una pre-columna Supelguard-H, 50x4.6 mm (Supelco), usando como fase móvil ácido fosfórico (0.1 g/100 g), y con un flujo de 0.5 mL/min. El cromatógrafo Hewlett Packard HP-1100A estaba equipado con dos detectores: Un detector de Diodo Array DAD G1315A (fijado a 210 nm) y un detector de índice de refracción RID G-1362 A.

Los ácidos orgánicos y azúcares se identificaron mediante comparación del tiempo de retención con el tiempo de retención del estándar previamente analizado. Como estándares de ácidos orgánicos se utilizaron: ácido L-ascórbico, ácido málico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido acético, ácido láctico y ácido succínico. Todos ellos fueron suministrados por Sigma (Poole, Dorset, Reino Unido). Como estándares de azúcares se utilizaron: glucosa, fructosa y sacarosa.

## 3.5. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

### 3.5.1. pH

Para la determinación del pH, se disolvió 1 gramo de muestra en 10 mL de agua destilada y desionizada. Se determinó el pH de la suspensión mediante un pH-metro GLP 21 Crison (Eutech Instruments Pte Ltd., Singapur). Realizando cada ensayo por triplicado.

### 3.5.2. ACTIVIDAD DE AGUA ( $A_w$ )

La medida de la actividad de agua se realizó por triplicado, utilizando un equipo Novasina Thermoconstanter Srpint TH-500 (Pfäffikon, Suiza). A una temperatura de  $25 \pm 1$  °C.

### 3.5.3. COLOR

El color fue estudiado en las coordenadas CIEL\*a\*b\*, en las cuales la coordenada L\* proporciona resultados de la luminosidad de las muestras, a\* hace referencia a la coordenada rojo-verde y el parámetro b\* a la coordenada amarilla-azul.

Para su determinación se utilizó un colorímetro Minolta CM-700 (Minolta Camera Co, Osaka, Japón). Utilizando el observador 10° y el iluminante D<sub>65</sub>. Para las mismas, se usaron cristales de baja reflectancia entre las muestras y el equipo, del tipo CR-A51/1829-752 (Minolta Camera Co. Osaka, Japón). Se realizaron 9 medidas por cada una de las muestras.

## 3.6. PROPIEDADES TECNOLÓGICAS

### 3.6.1. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA)

Para llevar a cabo esta determinación, primero se pesaron los tubos de vidrio vacíos (MT), se tararon y se les adicionó aproximadamente 0,5 gramos de muestra (ME). A cada uno de los tubos que contenían la fibra, se les adicionó 10 mL de agua, se agitó en un vortex unos 30 segundos aproximadamente, y se dejaron las muestras a temperatura ambiente durante toda la noche. Al siguiente día, las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a una velocidad de 3.000 r.p.m. en una centrífuga Nahita Model 2690. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante con una micropipeta de 5 mL. Se procedió a pesar el tubo (MTP) tras eliminar todo el sobrenadante en la medida de lo posible. Realizándose por triplicado esta determinación.

Los resultados de la capacidad de retención de aceite (g agua/g muestra), se determinaron mediante la siguiente expresión:

$$CRA = \frac{MTP - MT - ME}{ME}$$

Donde:

MTP: Masa del tubo y precipitado (g).

MT: Masa del tubo vacío (g).

ME: Masa de la muestra (g).

### 3.6.2. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE ACEITE (CRO)

Para la determinación de la CRO, inicialmente se pesaron los tubos de ensayo vacíos (MT), se tararon y se les adicionó aproximadamente 0,4 g de muestra (ME). Tras esto se les añadió 5 mL de aceite de girasol a cada tubo, se agitaron con ayuda de un vortex unos 30 segundos a velocidad media y se dejaron reposar toda la noche a temperatura ambiente. Al siguiente día, las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a una velocidad de 3.000 r.p.m. en una centrífuga Nahita Model 2690. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante con una micropipeta de 5 mL a cada tubo. Se procedió a pesar dichos tubos (MTP) tras eliminar todo el sobrenadante en la medida de lo posible. Esta determinación se realizó por triplicado.

La capacidad de retención de aceite (g aceite/g muestra), se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$CRO = \frac{MTP - MT - ME}{ME}$$

Donde:

MTP: Masa del tubo y precipitado (g).

MT: Masa del tubo vacío (g).

ME: Masa de la muestra (g).

### 3.6.3. CAPACIDAD DE HINCHAMIENTO (SWC)

El procedimiento para determinar la SWC fue, en tubos de 10 mL graduados se adicionó aproximadamente 0,5 g de muestra, se midió el volumen que ocupaba cada muestra ( $V_0$ ) y se anotó junto al peso exacto de fibra añadida. Posteriormente se adicionaron 5 mL de agua destilada, se agitó durante 1 minuto con ayuda de un vortex y se dejaron reposar durante 24 horas a temperatura

ambiente. Trascorridas las 24 horas, se midió el volumen final de las muestras ( $V_1$ ). Esta determinación se realizó por triplicado.

La capacidad de hinchamiento (mL de agua/g de muestra), se determinó mediante la siguiente expresión:

$$SWC = \frac{V_1 - V_0}{P \text{ muestra}}$$

Donde:

$V_1$ : Volumen de las muestra trascurridas las 24 h.(mL).

$V_0$ : Volumen inicial de las muestras (mL).

### 3.7. DETERMINACIÓN DEL PERFIL POLIFENÓLICO

#### 3.7.1. EXTRACCIÓN

La extracción de los compuestos se dividió en dos fracciones, libres y unidos. Para la extracción de los compuestos fenólicos libres se realizó siguiendo la metodología descrita por Genskowsky, et al., (2016). Se mezclan 2 gramos de la muestra con 10 mL de metanol acidificado (1% HCl). Tras ello, se sonicó durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugan 10 minutos a 4°C y 7100xg. El sobrenadante, el cual contiene los compuestos fenólicos libres, se recoge y se evapora bajo vacío. El residuo generado se resuspenden con 5 mL de una mezcla metanol:agua (50:50 v/v). Respecto a los compuestos fenólicos unidos, se lleva a cabo el método descrito por Mpofo et al. (2006), usando el pellet remanente después de la extracción de los polifenoles libres. El extracto de etil acetato se evaporó bajo vacío, y después resuspendido en 5 mL de metanol:agua en caso de muestras no digeridas y 2 mL en caso de muestras digeridas.

#### 3.7.2. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

La detección de la fracción libre y unida de polifenoles fue llevada a cabo en un HPLC Hewlett-Packard series 1200 equipado con una columna C18 Mediterranean Sea 18, 25 x 0,4 cm, 5 µm de tamaño de partícula (Teknokroma, Barcelona, España). 20 µm de la muestra se eluye con un gradiente de 1 mL/min. Las fases móviles estaban compuestas de una mezcla de dos disolventes. El disolvente A contenía ácido fórmico en agua (1:99, v/v) y el disolvente B por

acetonitrilo (100%). El gradiente de disolventes era, a minuto 0 – 5% disolvente B, a minuto 20 – 25% de disolvente B, a minuto 40 – 50% disolvente B, y a minuto 45 – 5% disolvente B. La detección se realizó por absorción UV a longitudes de onda de 280, 325 y 360 nm. La identificación de los polifenoles se realizó comparando los tiempos de retención y el espectro observado en las muestras con estándares puros inyectados en las mismas condiciones. Respecto a la cuantificación, se consiguió usando curvas de calibrado de cuatro puntos siguiendo los estándares puros. Todo esto ha sido llevado a cabo siguiendo la metodología descrita por Genskowsky, et al., (2016).

### 3.8. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN METILXANTINAS

El contenido en teobromina y cafeína se realizó sobre los extractos obtenidos en el punto 3.7.1. de esta memoria. El análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) se realizó siguiendo las directrices de Grillo et al. (2019). La identificación y la cuantificación de en teobromina y cafeína, se consiguió usando curvas de calibrado de cuatro puntos obtenidas a partir de los estándares puros.



### 3.9. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

#### 3.9.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE UTILIZANDO EL MÉTODO DEL RADICAL 2,2'-DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL (DPPH)

Las muestras utilizadas para la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH fueron los extractos extraídos según el procedimiento descrito en el apartado 3.7.1. de esta memoria. Para ello se siguió el método descrito por Brand-Williams et al., (1995). Para la determinación de la capacidad antioxidante se usó una curva de calibrado con diferentes concentraciones de Trolox. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de Trolox (TE) por gramo de muestra (mg TE/g muestra) como valor medio de tres repeticiones.

#### 3.9.2. PODER ANTIOXIDANTE POR REDUCCIÓN DEL IÓN FÉRRICO (FRAP)

Las muestras utilizadas para la determinación de la actividad antioxidante por el método FRAP fueron los extractos extraídos según el procedimiento descrito en el apartado 3.7.1. de esta memoria. Para ello se siguió el método descrito

por Oyaizu, (1986). Para la determinación de la capacidad antioxidante se usó una curva de calibrado con diferentes concentraciones de Trolox. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de Trolox (TE) por gramo de muestra (mg TE/g muestra) como valor medio de tres repeticiones.

### 3.9.3. CAPACIDAD QUELANTE DEL IÓN FERROSO (FIC)

Las muestras utilizadas para la determinación de la actividad antioxidante por el método FIC fueron los extractos extraídos según el procedimiento descrito en el apartado 3.7.1. de esta memoria. Para ello se siguió el método descrito por Mahdavi et al., (2017). Para la determinación de la capacidad antioxidante se usó una curva de calibrado con diferentes concentraciones de EDTA. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de EDTA (EDTAE) por gramo de muestra (mg EDTAE/g muestra) como valor medio de tres repeticiones.

### 3.9.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL EMPLEO DEL RADICAL 2,2'-AZINOBIS[3-ETILBENZOTIAZOLIN-6-SULFÓNICO] (ABTS)

Las muestras utilizadas para la determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS fueron los extractos extraídos según el procedimiento descrito en el apartado 3.7.1. de esta memoria. Para ello se siguió el método descrito por Gullón et al., (2015). Para la determinación de la capacidad antioxidante se usó una curva de calibrado con diferentes concentraciones de Trolox. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de Trolox (TE) por gramo de muestra (mg TE/g muestra) como valor medio de tres repeticiones.

## 3.10. ANALISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si existían diferencias estadísticas en la composición química, propiedades físico-químicas, tecno-funcionales y en la actividad antioxidantes entre las diferentes muestras obtenidas a partir de la cascara del grano de cacao se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA).

Para conocer si existían diferencias estadísticamente significativas entre las muestras se aplicó el test de rangos múltiples de Tukey ( $p < 0,05$ ). El análisis se realizó con el programa Statgraphics Centurion XVI Versión 16.1.15.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA

La composición química de la cáscara del cacao está condicionada por diversos factores como las condiciones ambientales de la zona de cultivo, la variedad de cacao, el proceso de cosechado y las condiciones del procesado como por ejemplo el tiempo de fermentación, el método de secado y la temperatura de tostado [10]. En la tabla 1, se puede observar el efecto que tiene el tamaño de partícula de las diferentes muestras en la composición química de la cáscara de cacao. En cuanto al contenido de humedad y cenizas, no se encontraron diferencias ( $p > 0,05$ ) entre los diferentes tamaños de partículas. El alto contenido de cenizas concuerda con los valores indicados por Martínez et al. (2012) en cáscara de cacao (7,35 g/ 100 g) procedente de Ecuador, pero más bajos que los valores demostrados por Agus et al. (2018) en cáscara de cacao procedente de Malasia (11,67 g /100 g).

El contenido de grasa y proteína varió con los diferentes tamaños de partícula, disminuyendo con el aumento del tamaño de partícula. De esta forma, tanto para proteínas como para grasas no se encontraron diferencias ( $p > 0,05$ ) entre HCBS e ICBS, mientras que LCBS mostró los valores más altos ( $p < 0,05$ ). Estos valores contradicen la tendencia mostrada en el estudio de Memon et al. (2020) quien halló que el contenido de proteínas y grasa en harina de trigo disminuía al hacerlo el tamaño de partícula. El aumento de la extracción de grasa y proteína en los tamaños más pequeños de partícula podría deberse al aumento del área superficial como mencionó Luthria et al. (2004).

**Tabla 1.** Efecto del tamaño de partícula de las harinas obtenidas a partir de cáscara de cacao sobre la composición química.

	<b>Humedad</b>	<b>Proteína</b>	<b>Grasas</b>	<b>Ceniza</b>	<b>TDF</b>
<b>HCBS</b>	7,05±0,13 <sup>a</sup>	15,59±0,22 <sup>b</sup>	3,00±0,02 <sup>b</sup>	7,09±0,73 <sup>a</sup>	65,58±0,53 <sup>a</sup>
<b>ICBS</b>	6,90±0,36 <sup>a</sup>	15,95±0,13 <sup>b</sup>	3,60±0,19 <sup>b</sup>	7,03±0,65 <sup>a</sup>	62,03±0,13 <sup>b</sup>
<b>LCBS</b>	6,79±0,19 <sup>a</sup>	17,13±0,17 <sup>a</sup>	5,60±0,24 <sup>a</sup>	7,34±0,35 <sup>a</sup>	61,18±0,94 <sup>b</sup>

Valores expresados en g/100g de muestra. HCBS: mayor tamaño de partícula ( $D_p > 701 \mu\text{m}$ ); ICBS: tamaño intermedio de partícula ( $417 < D_p < 701 \mu\text{m}$ ); LCBS: menor tamaño de partícula ( $D_p < 417 \mu\text{m}$ ). TDF: fibra dietética total. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según la prueba de rango múltiple de Tukey.

Los contenidos de grasa y proteínas obtenidos en este estudio fueron similares a los valores hallados por Rojo-Poveda et al., (2019). en la cáscara de cacao procedente de São Tomé (variedad Forastero) con valores de proteína y grasa de 6,2 y 1,8 g/ 100g, respectivamente. Con respecto al total de la fibra dietética (Tabla 1) los resultados obtenidos mostraron que el mayor contenido de fibra dietética ( $p < 0,05$ ) se encontraba en el tamaño más grande de partícula (HCBS) mientras que para los tamaños más pequeños (ICBS y LCBS) no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellos.

Diferentes datos bibliográficos sobre los valores de fibra dietética en cáscara de cacao mostraron valores en un rango entre 39,25-66,33 g/100 g (Lecumberri et al., 2007; Martínez et al., 2012; Rojo-Poveda et al., 2019). Las fibras dietéticas tienen todas las características necesarias para ser un ingrediente importante en la formulación de nuevos alimentos con propiedades funcionales. Además, se han encontrado evidencias considerables de estudios epidemiológicos, clínicos y bioquímicos de que la fibra ejerce una influencia positiva en la salud humana. La fibra dietética puede proteger ante enfermedades cardiovasculares y proporcionar mejoras para la salud gastrointestinal y la tolerancia a la glucosa y respuesta a la insulina, y reducir el riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer e influir en la absorción de lípidos contribuyendo de esta forma en cierto grado al control de peso (Viuda-Martos et al., 2013; Shah et al., 2020).

#### 4.2 CONTENIDO DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y AZÚCARES

En todas las harinas, procedentes de la cáscara de cacao, analizadas se encontraron seis ácidos orgánicos (oxálico, cítrico, succínico, tartárico, málico y ácidos acéticos) con un valor total en un rango entre 11,85 y 14,34 mg/g como se muestra en la Tabla 2. En cuanto al tamaño de partícula solo se han encontrado diferencias en los ácidos oxálico, cítrico y acético cuya concentración aumentaba cuando el tamaño de partícula disminuía. En cuanto a los ácidos tartárico, succínico y málico no se encontraron diferencias ( $p > 0,05$ ) entre los diferentes tamaños de partícula. El ácido tartárico, seguido del ácido málico fueron los dos que mostraron una mayor concentración en las muestras analizadas. No hay muchos datos bibliográficos sobre la concentración de ácidos orgánicos en

la cáscara de cacao. Sin embargo, se analiza más el contenido de ácidos orgánicos en la almendra de cacao. Sobre esto, Hamdouche et al. (2019) encontró y cuantificó cinco ácidos orgánicos no volátiles (cítrico, málico, láctico, oxálico y tartárico) en almendras de cacao cultivadas en Costa de Marfil. La producción y el tipo de ácidos orgánicos depende de numerosos factores como el tipo y el tiempo de fermentación, los microorganismos involucrados, la variedad del cacao, etc.

**Tabla 2.** Efecto del tamaño de partícula de las harinas obtenidas a partir de cáscara de cacao sobre el contenido de ácidos orgánicos.

	Ácido oxálico	Ácido cítrico	Ácido succínico	Ácido tartárico	Ácido málico	Ácido acético	TOTAL
<b>HCBS</b>	1,57±0,07 <sup>cB</sup>	1,62±0,13 <sup>cB</sup>	2,50±0,41 <sup>aA</sup>	2,68±0,02 <sup>aA</sup>	2,46±0,14 <sup>aA</sup>	1,03±0,01 <sup>cC</sup>	11,85±0,23 <sup>b</sup>
<b>ICBS</b>	1,62±0,04 <sup>bC</sup>	1,97±0,06 <sup>bB</sup>	2,20±0,33 <sup>aA</sup>	2,61±0,08 <sup>aA</sup>	2,47±0,10 <sup>aA</sup>	1,33±0,03 <sup>bD</sup>	12,20±0,14 <sup>b</sup>
<b>LCBS</b>	2,33±0,10 <sup>aB</sup>	2,76±0,11 <sup>aA</sup>	2,06±0,09 <sup>aC</sup>	2,79±0,06 <sup>aA</sup>	2,67±0,12 <sup>aA</sup>	1,72±0,17 <sup>aD</sup>	14,34±0,11 <sup>a</sup>

Valores expresados en g/100g de muestra. HCBS: mayor tamaño de partícula ( $D_p > 701 \mu\text{m}$ ); ICBS: tamaño intermedio de partícula ( $417 < D_p < 701 \mu\text{m}$ ); LCBS: menor tamaño de partícula ( $D_p < 417 \mu\text{m}$ ). TDF: fibra dietética total. Valores con diferente letra minúscula en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test múltiple de Tukey. Valores con diferente letra mayúscula en la misma columna indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) según la prueba de rango múltiple de Tukey.

En cuanto al contenido de azúcares (Tabla 3) el contenido total varió entre los diferentes tamaños de partícula, aumentando de 13,70 a 15,57 mg/ g al disminuir el tamaño de partícula. En todas las muestras analizadas se identificaron y cuantificaron cuatro monosacáridos, de los cuales la glucosa fue la que se encontró en mayor cantidad ( $p < 0,05$ ), seguida de la fructosa. Por otro lado, la sacarosa fue el azúcar encontrado en una menor concentración ( $p < 0,05$ ) en las muestras analizadas.

**Tabla 3.** Efecto del tamaño de partícula de las harinas obtenidas a partir de cáscara de cacao sobre el contenido de azúcares.

	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Arabinosa	TOTAL
<b>HCBS</b>	1,12±0,07 <sup>bC</sup>	5,81±0,03 <sup>cA</sup>	5,06±0,04 <sup>bB</sup>	1,21±0,04 <sup>cC</sup>	13,20±0,12 <sup>c</sup>
<b>ICBS</b>	1,22±0,07 <sup>abD</sup>	6,17±0,04 <sup>bA</sup>	5,17±0,14 <sup>bB</sup>	1,56±0,04 <sup>bC</sup>	14,10±0,09 <sup>b</sup>
<b>LCBS</b>	1,34±0,10 <sup>aD</sup>	6,33±0,01 <sup>aA</sup>	5,45±0,08 <sup>aB</sup>	2,45±0,04 <sup>aC</sup>	15,57±0,08 <sup>a</sup>

Valores expresados en g/100g de muestra. HCBS: mayor tamaño de partícula ( $D_p > 701 \mu\text{m}$ ); ICBS: tamaño intermedio de partícula ( $417 < D_p < 701 \mu\text{m}$ ); LCBS: menor tamaño de partícula ( $D_p < 417 \mu\text{m}$ ). TDF: fibra dietética total. Valores con diferente letra minúscula en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test múltiple de Tukey. Valores con diferente letra mayúscula en la misma columna indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) según la prueba de rango múltiple de Tukey.

Los resultados obtenidos contradicen a los que mostró el estudio de Redgwell et al. (2003) quien analizó los azúcares que contenía la cáscara de cacao tostado procedente de África Occidental de la variedad Forastero. Dichos estudios hallaron que los monosacáridos que se encontraban en mayor cantidad fueron: glucosa, galactosa, manosa, xilosa, arabinosa, fucosa y ramnosa. Por otro lado, los estudios de Jokic et al. (2018) mostraron unos resultados similares en los que los monosacáridos encontrados en mayor cantidad fueron: glucosa, ramnosa, arabinosa, manosa y xilosa. La concentración y el tipo de azúcares presentes en la cáscara de cacao dependen de las temperaturas alcanzadas durante la fermentación y el proceso de tostado.

#### 4.3. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y TECNOFUNCIONALES

En la Tabla 4 se muestran los valores correspondientes al pH, la actividad de agua y las coordenadas de color de la cáscara de cacao correspondientes a los diferentes tamaños de partícula. En cuanto al pH, los valores obtenidos se encuentran entre 4,93 y 5,07. No encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las muestras ICBS y LCBS, mientras que la muestra HCBS fue la que mostró los valores más elevados ( $p < 0,05$ ). La disminución de los valores de pH en los tamaños más pequeños de partícula podría deberse al elevado contenido de ácidos orgánicos que muestran. En cuanto a la actividad de agua, la disminución del tamaño de partícula supuso un aumento de los valores. Por lo tanto, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ICBS y LCBS, mientras que HCBS mostró los valores más bajos ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 4.** Efecto del tamaño de partícula de las harinas obtenidas a partir de cáscara de cacao sobre las propiedades físico-químicas.

	Coordenadas de color				
	pH	Aw	L*	a*	b*
<b>HCBS</b>	5,07±0,03 <sup>a</sup>	0,474±0,001 <sup>b</sup>	45,97±0,75 <sup>c</sup>	5,78±0,19 <sup>c</sup>	8,16±0,48 <sup>c</sup>
<b>ICBS</b>	4,93±0,03 <sup>b</sup>	0,495±0,006 <sup>a</sup>	47,84±1,11 <sup>b</sup>	6,53±0,31 <sup>b</sup>	9,45±0,55 <sup>b</sup>
<b>LCBS</b>	4,90±0,06 <sup>b</sup>	0,501±0,004 <sup>a</sup>	50,17±0,31 <sup>a</sup>	8,06±0,09 <sup>a</sup>	11,84±0,18 <sup>a</sup>

HCBS: mayor tamaño de partícula ( $D_p > 701 \mu\text{m}$ ); ICBS: tamaño intermedio de partícula ( $417 < D_p < 701 \mu\text{m}$ ); LCBS: menor tamaño de partícula ( $D_p < 417 \mu\text{m}$ ). Valores con la misma letra en la misma columna no muestran diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) según la prueba de rango múltiple de Tukey.

En referencia a las coordenadas de color (Tabla 4), las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  se vieron afectadas ( $p < 0,05$ ) por la reducción del tamaño de partícula. Por lo tanto, en todos los parámetros de color los valores aumentaron con la disminución del tamaño de partícula ( $p < 0,05$ ). Por lo tanto, el valor más alto de las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  se encontró en el tamaño de partícula más pequeño. En el caso de la luminosidad ( $L^*$ ) este comportamiento se debe al aumento del área superficial, ya que como indicó Yu et al. (2018) cuanto mayor es el área de superficie, mayor es la cantidad de luz que reflecta.

En el caso de las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$  esta conducta puede estar relacionada con la liberación de diversos compuestos como pigmentos. De hecho, el proceso de molido tiene gran influencia en numerosos componentes como ceniza, proteína, pigmentos y el contenido de fibra dietética que sufre algún tipo de daño lo que a su vez influye de forma significativa en el color tal como indica Hidalgo et al. (2014). Es importante destacar que el color de la cáscara de cacao, además de estar influido por el tamaño de partícula, está también influido por otros parámetros como las condiciones en las que se llevan a cabo los procesos de fermentación y de secado, así como las posteriores condiciones de tostado.

En cuanto a las propiedades tecno-funcionales, la reducción del tamaño de partícula tiene un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) en la capacidad de retención de agua, capacidad de retención de aceite y la capacidad de hinchamiento de las muestras de cáscara de cacao que se pueden observar en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Efecto del tamaño de partícula de las harinas obtenidas a partir de cáscara de cacao sobre las propiedades tecno-funcionales.

	<b>CRA</b>	<b>CRO</b>	<b>SWC</b>
<b>HCBS</b>	5,07±0,27 <sup>a</sup>	2,74±0,08 <sup>a</sup>	3,16±0,05 <sup>a</sup>
<b>ICBS</b>	4,15±0,19 <sup>b</sup>	1,55±0,05 <sup>b</sup>	2,49±0,10 <sup>b</sup>
<b>LCBS</b>	3,30±0,20 <sup>c</sup>	1,28±0,08 <sup>c</sup>	1,31±0,08 <sup>c</sup>

HCBS: mayor tamaño de partícula ( $D_p > 701 \mu\text{m}$ ); ICBS: tamaño intermedio de partícula ( $417 < D_p < 701 \mu\text{m}$ ); LCBS: menor tamaño de partícula ( $D_p < 417 \mu\text{m}$ ). CRA: capacidad de retención de agua (g agua/g muestra); OHC: capacidad de retención de aceite (g aceite/ g muestra); SWC: capacidad de hinchamiento (mL/g muestra). Valores con la misma letra en la misma columna no muestran diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) según la prueba de rango múltiple de Tukey.

Todos los valores obtenidos de las propiedades tecno-funcionales analizadas, disminuían significativamente ( $p < 0,05$ ) al disminuir el tamaño de partícula siguiendo un comportamiento muy similar al que ocurre en las propiedades tecno-funcionales analizadas en otras harinas. De esta forma, Jacobs et al. (2015) indicó que las propiedades de hidratación del salvado de trigo grueso comercial disminuyeron cuando se redujo el tamaño de partícula y Lucas-González et al. (2017) mencionó que, en harinas obtenidas de coproductos procedentes del persimon (*Diospyros kaki* Trumb), se observaba una reducción de dichas propiedades cuando se disminuía el tamaño de partícula. Se ha demostrado (Ancona et al., 2004; Noor et al., 2010) que la reducción de la capacidad de retención de agua, de la capacidad de retención de aceite y de la capacidad de hinchamiento en tamaños finos de partículas podría deberse a diversos factores como (i) una reducción de la absorción directa, (ii) una reducción de las fuerzas capilares, (iii) una reducción de las propiedades superficiales de las partículas y (iv) la naturaleza hidrofóbica de la fibra soluble, así como el contenido y el tipo (soluble o insoluble) de la misma. Los valores obtenidos en este estudio para la capacidad de retención de agua y aceite y para la capacidad de hinchamiento, fueron similares a los obtenidos por Martínez et al. (2012) en cáscara de cacao procedente de dos localizaciones distintas de Ecuador.

#### 4.4 PERFIL DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

De todos los productos y coproductos obtenidos a partir de la industrialización del cacao, es la cáscara del grano de cacao la que muestra una mayor concentración de compuestos polifenólicos. Por tanto, estos coproductos han demostrado ser una fuente buena y barata de estos compuestos bioactivos. El perfil polifenólico de las muestras de cáscara de cacao analizadas según su tamaño de partícula, se muestra en la Tabla 6. Tanto el contenido de polifenoles libres, como el de polifenoles ligados se vieron significativamente afectados por el tamaño de partícula.

Por lo tanto, en todos los compuestos identificados, la mayor concentración se encontraba en el tamaño más pequeño de partícula; en otras palabras, se obtuvo un incremento de la tasa de extracción de compuestos polifenólicos con

la disminución del tamaño de partícula. Este comportamiento es similar a los que podemos encontrar en datos bibliográficos (Lucas-González et al., 2018; 41. Zaiter et al. 2018) donde el contenido de compuestos polifenólicos se compara con el tamaño de partícula. El tamaño de partícula es uno de los factores más importantes que puede afectar a la eficiencia de extracción; debido a que el tamaño de partícula controla la cinética de transferencia de masa, así como el acceso del solvente, para una mejor permeabilidad o difusividad, a los compuestos bioactivos (Meullemiestre et al., 2016).

**Tabla 6.** Efecto del tamaño de partícula de las harinas obtenidas a partir de cáscara de cacao sobre perfil de compuestos polifenólicos.

		HCBS	ICBS	LCBS
<b>Catequina</b>	Libre	1966,89±54,98 <sup>c</sup>	2493,37±32,25 <sup>b</sup>	4211,82±29,81 <sup>a</sup>
	Unido	143,91±9,76 <sup>c</sup>	224,12±18,23 <sup>b</sup>	354,76±8,25 <sup>a</sup>
	<b>TOTAL</b>	<b>2110,88±12,59</b>	<b>2717,49±28,96</b>	<b>4566,58±16,96</b>
<b>Epicatequina</b>	Libre	4467,41±31,99 <sup>c</sup>	4815,92±29,76 <sup>b</sup>	6087,49±25,87 <sup>a</sup>
	Unido	95,28±7,34 <sup>c</sup>	114,59±8,76 <sup>b</sup>	249,69±12,92 <sup>a</sup>
	<b>TOTAL</b>	<b>4562,69±16,36</b>	<b>4930,51±17,96</b>	<b>6337,18±17,82</b>
<b>Derivados</b>	Libre	392,09±8,63 <sup>c</sup>	442,24±9,14 <sup>b</sup>	482,85±11,67 <sup>a</sup>
<b>Epicatequina</b>	Unido	N.D.	N.D.	N.D.
	<b>TOTAL</b>	<b>392,09±8,63</b>	<b>442,24±9,14</b>	<b>482,85±11,67</b>
<b>Quercentina</b>	Libre	128,34±8,34 <sup>c</sup>	167,69±10,89 <sup>b</sup>	227,15±8,52 <sup>a</sup>
	Unido	2,40±0,12 <sup>c</sup>	4,53±0,22 <sup>b</sup>	6,98±0,37 <sup>a</sup>
	<b>TOTAL</b>	<b>130,74±3,57</b>	<b>172,22±4,23</b>	<b>234,13±5,36</b>
<b>Quercentina-3-O-glucosdo</b>	Libre	100,35±1,59 <sup>c</sup>	123,07±3,82 <sup>b</sup>	289,61±4,36 <sup>a</sup>
	Unido	3,35±0,14 <sup>c</sup>	4,09±0,27 <sup>b</sup>	7,33±0,48 <sup>a</sup>
	<b>TOTAL</b>	<b>103,70±0,85</b>	<b>127,16±0,98</b>	<b>296,94±2,12</b>
<b>Quercentina-3-O-rutinosdo</b>	Libre	92,70±3,87 <sup>c</sup>	137,89±8,56 <sup>b</sup>	237,53±9,72 <sup>a</sup>
	Unido	1,48±0,09 <sup>c</sup>	1,61±0,08 <sup>b</sup>	3,73±0,12 <sup>a</sup>
	<b>TOTAL</b>	<b>94,18±1,14</b>	<b>139,50±3,14</b>	<b>241,26±5,21</b>
<b>Ácido protocateico</b>	Libre	N.D.	N.D.	N.D.
	Unido	80,53±1,92 <sup>c</sup>	100,79±2,98 <sup>b</sup>	148,93±1,23 <sup>a</sup>
	<b>TOTAL</b>	<b>80,53±1,92</b>	<b>100,79±2,98</b>	<b>148,93±1,23</b>

Valores expresados en µg/g de muestra. HCBS: mayor tamaño de partícula (Dp > 701 µm); ICBS: tamaño intermedio de partícula (417 < Dp < 701µm); LCBS: menor tamaño de partícula (Dp < 417µm). Valores con la misma letra minúscula en la misma fila no indican diferencias significativas (p > 0,05) según la prueba de rango múltiple de Tukey.

La concentración de compuestos polifenólicos libres fue mayor que la de compuestos polifenólicos ligados. En el caso de los compuestos polifenólicos libres, fueron identificados seis compuestos en todos los tamaños de partícula analizados, estos fueron clasificados como flavon-3-ols (catequina, epicatequina y derivados de la epicatequina) y flavonoles (quercetina, quercetina-3-O-glucosido y quercetina-3-O-rutinosido), mientras que en el caso de los compuestos polifenólicos ligados, fueron identificados dos flavan-3-ols (catequina y epicatequina) y tres flavonoles (quercetina, quercetina-3-O-glucosido y quercetina-3-O-rutinosido) y un ácido dihidroxibenzoico (ácido protocateico).

El principal compuesto polifenólico ( $p < 0,05$ ) en todas las muestras analizadas de cáscara de cacao fue la epicatequina, seguido de la catequina. Estos resultados concordaban con los datos mostrados en los estudios de Hernández-Hernández et al. (2019) quien analizó un total de 52 cáscaras de cacao obtenidas de distintos genotipos de cacao cultivado en México. Estos autores hallaron que la epicatequina era el compuesto polifenólico más importante con valores entre 4,40 y 34,97 mg/ g mientras que el contenido de catequina se encontraba en un rango desde 0,55 a 3,33 mg/ g. De una forma similar, Papillo et al. (2019) analizó el perfil polifenólico de extractos de la cáscara de cacao que fueron obtenidos con diferentes disolventes, técnicas de extracción y tiempos. Estos autores mostraron que en todos los métodos de extracción ensayados el compuesto polifenólico más abundante era la epicatequina (0,50-2,10 mg/g), mientras que la catequina estaba presente en menor cantidad (0,21-1,05 mg/g). En otro estudio, Jokic et al. (2018) analizaron el contenido polifenólico de extractos de la cáscara de cacao obtenidos mediante una extracción con fluidos supercríticos y hallaron que los principales compuestos polifenólicos en todas las muestras analizadas eran la epicatequina y la catequina con valores en un rango de 0,19 a 3,29 g/100 g y de 0,07 a 0,45 g/ 100g respectivamente.

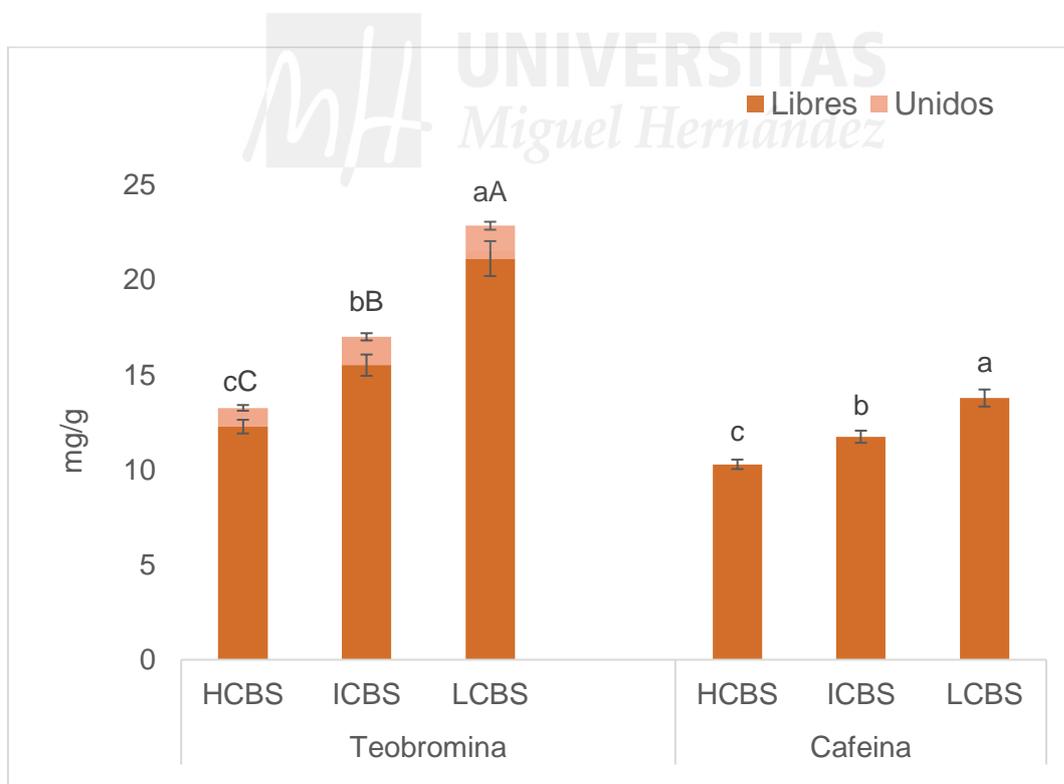
Esta gran variabilidad mostrada por la cáscara de cacao podría deberse a diferentes factores como la variedad de cacao y el genotipo, las condiciones ambientales y de cultivo, pero fundamentalmente a las condiciones de tiempo, pH y temperaturas en las que se lleva a cabo la fermentación, ya que es en esta etapa

en la que los compuestos polifenólicos migran desde los cotiledones de la semilla de cacao a la cáscara.

#### 4.5 CONTENIDO DE METILXANTINAS

Las metilxantinas como la teobromina, la cafeína y la teofilina son otro tipo importante de fitoquímicos que se encuentran en la cáscara de cacao. Estos compuestos, principalmente la teobromina y la cafeína han sido asociados con numerosos efectos beneficiosos en la salud humana donde actúan como anti-cancerígenos, anti-obesidad o agente diuréticos entre otros efectos (Papillo et al., 2019).

En la Figura 6 se muestra el efecto del tamaño de partícula en el contenido de metilxantinas (teobromina y cafeína) en harina de la cáscara de cacao. Como ocurre con el perfil polifenólico, el tamaño de partícula tiene un impacto significativo en el contenido de metilxantinas.



**Figura 6.** Efecto del tamaño de partícula de las harinas obtenidas a partir de cáscara de cacao sobre el contenido en metilxantinas (teobromina y cafeína).

Valores expresados en mg/g de muestra. HCBS: mayor tamaño de partícula ( $D_p > 701 \mu\text{m}$ ); ICBS: tamaño intermedio de partícula ( $417 < D_p < 701 \mu\text{m}$ ); LCBS: menor tamaño de partícula ( $D_p < 417 \mu\text{m}$ ). Para cada compuesto libre, valores con la misma letra minúscula no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) según la prueba de rango múltiple de Tukey. Para cada compuesto unido, valores con la misma letra mayúscula no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) según la prueba de rango múltiple de Tukey.

Las cantidades más elevadas tanto para teobromina como para cafeína fueron encontradas en el tamaño de partícula más pequeño. En el caso de la teobromina ( $p < 0,05$ ) la concentración más alta se alcanzó en LCBS con valores entre 12,27 mg/g (10,54 mg/g en la fracción libre y 1,73 mg/g en la fracción ligada) mientras que HCBS mostró los valores ( $p < 0,05$ ) más bajos (7,12 mg/g; 6,13 mg/g en la fracción libre y 0,99 mg/g en la fracción ligada).

Estos valores son similares a los mostrados en la bibliografía científica. Por lo tanto, Okiyama et al. (2018) llevó a cabo un estudio para analizar el contenido de teobromina en cáscara de cacao procedente de Brasil y hallaron una concentración de 9,89 mg/g de muestra. Hernández-Hernández et al. (2018) analizaron la cantidad de teobromina en cáscara de cacao comercial. Estos autores hallaron que las muestras analizadas tenían una cantidad de teobromina de 12 mg/g de muestra. En un estudio similar, Barbosa-Pereira et al. (2018) investigaron el contenido el contenido de teobromina presente en cáscara de cacao de las variedades Trinitario, Criollo x Trinitario, y Forastero cultivados en Trinidad, México, Honduras y Santo Tomé, respectivamente. Ellos hallaron un contenido de teobromina de 8,24; 10,57; 10,07 y 9,29 mg/g respectivamente. Este elevado contenido de teobromina puede explicarse con la migración de metilxantinas del grano de cacao a la cáscara durante el proceso de fermentación.

En el caso de la cafeína (Figura 6), ocurre lo mismo que en el caso de la teobromina, la concentración ( $p < 0,05$ ) más elevada fue obtenida en LCBS con valores de 6,13 mg/g, seguido de ICBS con un valor de 5,11 mg/g. Los valores obtenidos en este estudio fueron más elevados que los obtenidos por Jokic et al. (2018) quien informó de que el contenido de cafeína en extractos de cáscara de cacao obtenidos mediante una extracción con agua subcrítica se encontraba en un rango entre 0,4 y 2,5 mg/g. De forma similar, Barbosa-Pereira et al. (2018) investigó el contenido de cafeína presente en cáscara de cacao de la variedad Trinitario, Criollo x Trinitario, y Forastero cultivados en Venezuela, Colombia y Ecuador, respectivamente. En dicho estudio mostraron un contenido de cafeína en un rango de 1,61 a 4,08 mg/g. La figura S4 del material suplementario mostró

los cromatogramas de metilxantinas encontradas en las muestras de cáscara de cacao analizadas.

#### 4.6 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

Para la determinación de la actividad antioxidante, se utilizaron cuatro métodos distintos (ensayo de eliminación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH); ensayo de eliminación de radicales 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS); poder antioxidante reductor férrico (FRAP); ensayo de la capacidad quelante de iones ferrosos (FIC)) para determinar la actividad de diferentes fracciones granulométricas (Tabla 7). La reducción del tamaño de partícula de la harina de cáscara de cacao mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las propiedades antioxidantes. Por tanto, en todos los métodos utilizados, los valores más altos ( $p < 0,05$ ) de actividad antioxidante fueron obtenidos en las partículas más pequeñas.

**Tabla 7.** Efecto del tamaño de partícula de las harinas obtenidas a partir de cáscara de cacao sobre las propiedades antioxidantes

	<b>DPPH (mg TE/g)</b>	<b>ABTS (mg TE/g)</b>	<b>FRAP (mg TE/g)</b>	<b>FIC (mg EDTAE/g)</b>
<b>HCBS</b>	2,35±0,11 <sup>c</sup>	3,39±0,20 <sup>c</sup>	3,84±0,02 <sup>c</sup>	0,28±0,01 <sup>c</sup>
<b>ICBS</b>	4,21±0,05 <sup>b</sup>	6,49±0,44 <sup>b</sup>	5,30±0,02 <sup>b</sup>	0,40±0,03 <sup>b</sup>
<b>LCBS</b>	5,53±0,04 <sup>a</sup>	11,55±0,46 <sup>a</sup>	7,62±0,04 <sup>a</sup>	0,54±0,02 <sup>a</sup>

HCBS: mayor tamaño de partícula ( $D_p > 701 \mu\text{m}$ ); ICBS: tamaño intermedio de partícula ( $417 < D_p < 701 \mu\text{m}$ ); LCBS: menor tamaño de partícula ( $D_p < 417 \mu\text{m}$ ). DPPH: ensayo de eliminación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; ABTS: ensayo de eliminación de radicales de 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico); FRAP: Poder antioxidante reductor férrico; FIC: ensayo de capacidad quelante de iones ferrosos. TE: Equivalentes de Trolox. EDTA: etilendiaminotetraacético. Los valores seguidos de la misma letra minúscula dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) según la prueba de rango múltiple de Tukey.

Este comportamiento podría deberse a que las partículas de mayor tamaño la matriz está menos alterada lo que produce una liberación menor de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, mientras que la reducción de la matriz mediante la molienda podría provocar una mayor liberación de compuestos bioactivos lo que causaría un aumento en su efecto antioxidante.

Las propiedades antioxidantes obtenidas en este estudio coinciden con los datos mostrados en otros estudios sobre la cáscara de cacao. Arlorio et al. (2005)

evaluó las propiedades antioxidantes de extractos de cáscara de cacao obtenidos mediante la extracción con fluidos supercríticos usando CO<sub>2</sub>. Estos autores mostraron que la cáscara de cacao tenía un porcentaje de inhibición comparable a los obtenidos con butilhidroxianisol 0,1 mM. De la misma forma, Martínez et al. (2012) analizaron las propiedades antioxidantes usando tres métodos distintos, en cáscara de cacao cultivado en dos zonas distintas de Ecuador. Los valores mostrados en este estudio se encontraban en un rango entre 4,45 y 4,56  $\mu$ M equivalentes de Trolox/ g mediante el método ABTS; 3,81 y 4,05  $\mu$ M equivalentes de Trolox/ g mediante el método DPPH; o 1,51 y 1,78  $\mu$ M equivalentes de Trolox/ g mediante el método FRAP.



## 5. CONCLUSIONES

1. En la composición química, el contenido de humedad y cenizas no presentan diferencias significativas al disminuir el tamaño de partícula. Sin embargo, con la reducción del tamaño de partícula, los valores de grasa y proteína presentan un aumento mientras que en el caso de la fibra dietética total se observa una disminución.

2. En cuanto al contenido de ácidos orgánicos, en las muestras analizadas se identificaron seis ácidos. El contenido total de los mismos aumentó al reducirse el tamaño de partícula.

3. En cuanto al contenido de azúcares, se identificaron cuatro monosacáridos en las muestras. La reducción del tamaño de partícula provocó un incremento en el contenido total de azúcares.

4. En cuanto a las propiedades físico-químicas, la reducción del tamaño de partícula provocó una disminución de los valores de pH. Por el contrario, la reducción del tamaño de partícula provocó un aumento de los valores de la actividad de agua y también de los valores obtenidos en las mediciones de color para las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ .

5. En las propiedades tecno-funcionales la reducción del tamaño de partícula provocó una disminución de los valores de capacidad de retención de agua, capacidad de retención de aceite y capacidad de hinchamiento.

6. En las muestras se identificaron 7 compuestos polifenólicos los cuales presentan un aumento de su concentración al reducirse el tamaño de partícula.

7. En cuanto al contenido de metilxantinas, se identificaron dos compuestos en las muestras los cuales muestran un aumento de su concentración al reducirse el tamaño de partícula.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Afoakwa, E.O. (2016). *Chocolate Science and Technology*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Agus, B.A.P., Mohamad, N.N., Hussain, N. (2019). Composition of unfermented, unroasted, roasted cocoa beans and cocoa shells from Peninsular Malaysia. *Food Measurement*, 12, 2581-2589.
- Ancona, D.B., Mercado, G.P., Ordoñez, Y.M., Blanco, S.F. (2004). Physicochemical characterization lima bean (*Phaseolus lunatus*) and Jack bean (*Canavalia ensiformis*) fibrous residues. *Food Chemistry*, 84, 287-295.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists (2007). Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed.; AOAC: Washington, DC, USA.
- Araujo, Q.R., Fernandes, C. A. F., Ribeiro, D. O., Efraim, P., Steinmacher, D., Lieberei, R., Bastide, P., & Araujo, T. G. (2014). Cocoa Quality Index - A proposal. *Food Control*, 46, 49–54
- Arlorio, M., Coisson, J.D., Travaglia, F., Varsaldi, F., Miglio, G., Lombardi, G., Martelli, A. (2005). Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from Theobroma cacao hulls extracted with supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Research International*, 38(89), 1009-1014.
- Badrie, N., Frances Bekele, E. S., Marek S. (2014). Cocoa Agronomy, Quality, Nutritional, and Health Aspects. *Food Science and Nutrition*, 55(5), 620–659.
- Barbosa-Pereira, L., Guglielmetti, A. Zeppa, G. (2018). Pulsed electric field assisted extraction of bioactive compounds from cocoa bean shell and coffee silver skin. *Food and Bioprocess Technology*, 11, 818-835.
- Belščak, A., Komes, D., Horžić, D., Ganić, K. K., Karlović, D. (2009). Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*, 42(5–6), 707–716.

- Bertazzo, A., Agnolin, F., Comai, S., Zancato, M., Costa, C. V. L., Seraglia, R., Traldi, P. (2011). The protein profile of *Theobroma cacao* L. seeds as obtained by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(14), 2035–2042.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Brunetto, M. del R., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., Gómez, Á., Ramos, G., & Romero, C. (2007). Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, 100(2), 459–467.
- C. Hernández- Hernández, Procopio Alejandro López-Andrade, Miguel A. Ramírez-Guillermo, Diana Guerra Ramírez, J.F.C.P. (2016). Evaluation of different fermentation processes for use by small cocoa growers in Mexico. *Food Science and Nutrition*, 4(5), 690–995.
- Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60, 273–280.
- Caso Barrea, L. (2016). *Laura Caso Barrera (Coord.): Cacao. Producción, consumo y comercio. Del período prehispánico a la actualidad América Latina.*
- Clímaco Álvarez, Lumidla Tovar, Héctor García, Franklin Morillo, Pedro Sánchez, Cirilo Girón, A.D.F. (2002). Evaluación de la calidad comercial del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) usando dos tipos de fermentadores. *Revista Científica UDO Agrícola*, 10, 76-87.

- Deus, V.L., Bispo, E.S., Franca, A.S., Gloria, M.B.A. (2020). Influence of cocoa clones on the quality and functional properties of chocolate – Nitrogenous compounds. *LWT*, 134, 110202.
- Eskes, B. y C. Lanaud. (2001). *Cocoa. In: Tropical Plant Breeding*.
- Forsyth, W.G.C., y Quesnel, V.C. (1957). Cacao glycosidase and colour changes during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 8(9), 505–509.
- G. A. R., W., y Lass, R. A. (2001). *Cocoa Tropicla agriculture* (John Wiley & Son (ed.)).
- Genskowsky, E.; Puente, L.A.; Pérez-Álvarez, J.A.; Fernández-López, J.; Muñoz, L.A.; Viuda-Martos, M. (2016) Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui [*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz] a Chilean blackberry. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 96, 4235–4242,
- Grillo, G.; Boffa, L.; Binello, A.; Mantegna, S.; Cravotto, G.; Chemat, F.; Dizhbite, T.; Lauberte, L.; Telysheva G. (2019). Cocoa bean shell waste valorisation; extraction from lab to pilot-scale cavitation reactors. *Food Research International*, 115, 200-208
- Hernández Hernández, C. (2018). Análisis de la composición química del cacao, extracción y estudio de compuestos antioxidantes en genotipos del banco de germoplasma de México. *Universidad de Sevilla, Escuela Politécnica Superior de Ingeniería Agrícola*.
- Guehi, T., Cros, Emile Dingkuhn, M., Gérard, F., Ratomahenina, R. G. M., Vidal, A.C. (2006). Impact of cocoa processing technologies in free fatty acids formation in stored raw cocoa beans. *African Journal of Agricultural Research*, 3(3), 174–179.
- Gullón, B., Pintado, M.E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., Viuda-Martos, M. (2015) In Vitro gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica*

granatum) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability. *Journal of Functional Foods*, 19, 617-628.

Hamdouche, Y., Meile, J.C., Lebrun, M., Guehi, T., Boulanger, R., Teyssier, C., Didier Montet, D. (2019) Impact of turning, pod storage and fermentation time on microbial ecology and volatile composition of cocoa beans. *Food Research International*, 119, 477-491.

Hernández-Hernández, C., Morales-Sillero, A., Fernández-Bolaños, J., Bermúdez-Oria, A., Morales, A.A., Rodríguez-Gutiérrez, G. (2019) Cocoa bean husk: Industrial source of antioxidant phenolic extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 325-333.

Hernández-Hernández, C., Viera-Alcaide, I., Sillero, A.M.M., Fernández-Bolaños, J., Rodríguez-Gutiérrez, G. (2018) Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk. *Food Chemistry*, 240, 831-839.

Hidalgo, A., Fongaro, L., Brandolini, A. Wheat flour granulometry determines colour perception (2014). *Food Research International*, 64, 363-370.

Hurst, W.J., Krake, S.H., Bergmeier, S.C., Payne, M.J., Miller, K.B., Stuart, D. A. (2011). Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients. *Chemistry Central Journal*, 5(1), 53.

Jacobs, P.J., Hemdane, S., Dornez, E., Delcour, J.A., Courtin, C.M. (2015) Study of hydration properties of wheat bran as a function of particle size. *Food Chemistry*, 179(7), 296-304.

Jalil, A., y Ismail, A. (2008). Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health? *Molecules*, 13(9), 2190–2219.

- John, W. A., Böttcher, N.L., Aßkamp, M., Bergounhou, A., Kumari, N., Ho, P.W., D'Souza, R.N., Nevoigt, E., Ullrich, M.S. (2019). Forcing fermentation: Profiling proteins, peptides and polyphenols.
- Jokić, S., Gagić, T., Knez, Z., Šubaric D., Škerget M. (2018) Separation of active compounds from food by-product (cocoa shell) using subcritical water extraction. *Molecules*, 23, 1408.
- Kim, H., y Keeney, P.G. (1984). (-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans. *Journal of Food Science*, 49(4), 1090–1092.
- Kouamé, B. S. R., Baranton, S., Brault, P., Canaff, C., Chamorro-Coral, W., Cailard, A., De Oliveira Vigier, K., & Coutanceau, C. (2020). Insights on the unique electro-catalytic behavior of PtBi/C materials. *Electrochimica Acta*, 329, 135161.
- Lecumberri, E., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., Rupérez, P., Goya, L., Bravo, L. (2007) Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, 104, 948-954.
- Lessa, O.A., Reis, N.S., Leite, S.G.F., Gutarra, M.L.E., Souza, A.O., Gualberto, S.A., de Oliveira, J.R., Aguilar-Oliveira, E., Franco, M. (2018) Effect of the solid state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids. *Food Science Biotechnology*, 27, 107-113.
- Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Álvarez, J.A., Fernández-López, J. (2017). Evaluation of particle size influence on proximate composition, physicochemical, techno-functional and physio-functional properties of flours obtained from per-simmon (*Diospyros kaki* Trumb.) coproducts. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72, 67-73.
- Lucas-González, R.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J.A.; Viuda-Martos, M. (2018). Effect of particle size on phytochemical composition and antioxidant

- properties of two persimmon flours from *Diospyros kaki* Thunb. vars. 'Rojo Brillante' and 'Triumph' co-products. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 98, 504-510.
- Luthria, D.L., Noel, K., Vinjamoori, D. (2004). Impact of sample preparation on the determination of crude fat content in corn. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81, 999-1004.
- Mahdavi, B., Yaacob, W.A., Din, L.B. (2017) Chemical composition, antioxidant, and antibacterial activity of essential oils from *Etlintera sayapensis* A.D. Poulsen & Ibrahim Asian Pacific Journal of Tropical Medicine., 10, 819-826.
- Mariatti, F., Gunjević, V., Boffa, L., Cravotto, G. (2021). Process intensification technologies for the recovery of valuable compounds from cocoa by-products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 68, 102601.
- Martínez-Pinilla, E., Oñativia-Astibia, A., Franco, R. (2015). The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. *Frontiers in Pharmacology*, 6.
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M.A., Figueroa, J.G., Pérez-Álvarez, J.A., Viuda-Martos, M. (2012) Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49(1), 39-45.
- Radojčić Redovniković, Mazor Jolić, S., Marković, K., Ivanec Šipušić, Đ., Delonga, K. (2009). Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(9), 1793–1800.
- Melgarejo-Sánchez, P., Martínez, J.J., Legua, L., Martínez, R., Hernández, F., Melgarejo, P. (2015) Quality, antioxidant activity and total phenols of six Spanish pomegranates clones. *Scientia Horticulturae*, 182, 65-72.

- Memon, A.A., Mahar, I., Memon, R., Soomro, S., Harnly, J., Memon, N., Bhangar, M.I., Luthria, D.L. (2020). Impact of flour particle size on nutrient and phenolic acid composition of commercial wheat varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 86, 103358,
- Meullemiestre, A., Petitcolas, E., Maache-Rezzoug, Z., Chemat, F., Rezzoug, S.A. (2016). Impact of ultrasound on solid-liquid ex-traction of phenolic compounds from maritime pine sawdust waste. Kinetics, optimization and large scale experiments. *Ul-trasonics Sonochem*, 28, 230-239
- Mpofu, A., Sapirstein, H.D., Beta, T. (2006). Genotype and environmental variation in phenolic content, phenolic acid composition, and antioxidant activity of hard spring wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1265-1270.
- Natsume, M., y Baba, S. (2014). *Suppressive Effects of Cacao Polyphenols on the Development of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice* (pp. 189–198).
- Niemenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Omokolo Ndoumou, D., Lieberei, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 612–619.
- Noort, M.W., van Haaster, D., Hemery, Y., Schols, H.A., Hamer, R.J. (2010). The effect of particle size of wheat bran fractions on bread quality: evidence for fibre-protein interactions. *Journal of Cereal Science*, 52(1), 59-64.
- Okiyama, D.C.G., Navarro, S.L.B., & Rodrigues, C.E.C. (2017). Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 63, pp. 103–112)
- Okiyama, D.C.G., Soares, I.D., Cuevas, M.S., Crevelin, E.J., Moraes, L.A.B., MaMelo, M.P., Oliveira, A.L., Rodrigues, C.E.C. (2018). Pressurized liquid extraction of flavanols and alkaloids from cocoa bean shell using ethanol as solvent. *Food Research International*, 114, 20-29

- Oracz, J., Zyzelewicz, D., Nebesny, E. (2015). The Content of Polyphenolic Compounds in Cocoa Beans ( *Theobroma cacao* L.), Depending on Variety, Growing Region, and Processing Operations: A Review. *Food Science and Nutrition*, 55(9), 1176–1192.
- Oyaizu, M. (1986) Studies on products of browning reaction: Antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44, 307-315.
- Papillo, V.A., Locatelli, M., Travaglia, F., Bordiga, M., Garino, C., Coisson, J.D., Arlorio, M. (2019) Cocoa hulls polyphenols stabilized by microencapsulation as functional ingredient for bakery applications. *Food Research International*, 115, 511-518.
- Payne, M.J., Hurst, W.J., Miller, K.B., Rank, C., Stuart, D.A. (2010). Impact of Fermentation, Drying, Roasting, and Dutch Processing on Epicatechin and Catechin Content of Cacao Beans and Cocoa Ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10518–10527.
- Redgwell, R., Trovato, V., Merinat, S., Curti, D., Hediger, S., Manez, A. (2003) Dietary fibre in cocoa shell: characterisation of component polysaccharides. *Food Chemistry*, 81, 103-112.
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Mateus-Reguengo, L., Bertolino, M., Stévigny, C., Zeppa, G.E. (2019) Effects of particle size and extraction methods on cocoa bean shell functional beverage. *Nutrients*, 11, 867.
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Zeppa, G., Stévigny, C. (2020). Cocoa Bean Shell—A By-Product with Nutritional Properties and Biofunctional Potential. *Nutrients*, 12(4), 1123.
- Rusconi, M., & Conti, A. (2010). *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. In *Pharmacological Research* (Vol. 61, Issue 1, pp. 5–13). Academic Press.

- Servent, A., Boulanger, R., Davrieux, F., Pinot, M.N., Tardan, E., Forestier-Chiron, N., & Hue, C. (2018). Assessment of cocoa (*Theobroma cacao* L.) butter content and composition throughout fermentation
- Shah, B.R., Li, B., Al Sabbah, H., Xu, W., Mráz, J. (2020). Effects of prebiotic dietary fibers and probiotics on human health: With special focus on recent advancement in their encapsulated formulations. *Trends in Food and Science Technology*, 102, 178-192. Volume 102,
- Sukha, D.A., Butler, D.R., Umaharan, P., & Boulton, E. (2008). The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. *European Food Research and Technology*, 226(3), 405–413.
- Viuda-Martos, M., Fernández-Lopez, J., Pérez-Alvarez, J.A. (2013). Dietary fiber as an ingredient for the meat industry. In: *Dietary Fiber, Sources, properties and their relationship to health*. nova
- Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6), 423–447.
- Yu, D., Chen, J., Ma, J., Sun, H., Yuan, Y., Ju, Q., Teng, Y., Yang, M., Li, W., Fujita, K., Tatsumi E., Luan G. (2018). Effects of different milling methods on physicochemical properties of common buckwheat flour. *LWT- Food Science and Technology*, 92, 220-226.
- Zaiter, A., Becker, L., Baudelaire, E., Dicko, A. (2018). Optimum polyphenol and triterpene contents of *Hedera helix* (L.) and *Scrophularia nodosa* (L.): The role of powder particle size. *Microchemical Journal*, 137, 168-173.
- Żyżelewicz, D., Krysiak, W., Oracz, J., Sosnowska, D., Budryn, G., Nebesny, E. (2016). The influence of the roasting process conditions on the polyphenol

content in cocoa beans, nibs and chocolates. *Food Research International*, 89, 918–929.

